

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Michaela Brádlarová

Role autofágie v adaptaci kvasinkových buněk
Role of autophagy in yeast cell adaptation

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Kuthan, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 3. 2018

Podpis

Poděkování:

Děkuji mému školiteli, Mgr. Martinu Kuthanovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat mým rodičům, kteří mi byli oporou během celého studia.

Obsah

Abstrakt	6
Seznam často používaných zkratk	7
1 Úvod	8
2 Typy autofágie u kvasinek	9
2.1 Mikroautofágie	9
2.2 Makroautofágie	9
2.2.1 Geny ATG, charakterizace a funkce Atg proteinů	11
2.3 Specifická autofágie.....	12
2.3.1 Mitofágie	12
2.3.2 Retikulofágie.....	13
2.3.3 Dráha Cvt.....	14
3 Role monomerních GTP-vazebných proteinů v autofágii.....	15
3.1.1 Iniciace autofágie.....	15
3.1.2 Tvorba autofagosomu	15
3.1.3 Fúze autofagosomu a vakuoly	16
4 Regulace autofágie	17
4.1 Epigenetická regulace.....	17
4.2 Transkripční regulace	17
4.2.1 Ume6 a ATG8.....	17
4.2.2 Rph1 a ATG7	18
4.2.3 Pho23 a ATG9	18
4.2.4 Další transkripční regulátory	18
4.3 Posttranslační modifikace	18
4.3.1 Fosforylace	18
4.3.2 Acetylace	19
5 Odpověď kvasinkových buněk na dostupnost živin	19
5.1 Kináza TOR.....	19
5.1.1 Komplex TORC1	20
5.1.2 TORC1 a vztah k autofágii.....	20
5.1.3 EGO komplex	21
5.2 PKA	21
5.3 Regulace autofágie dostupností aminokyselin.....	22
6 Autofágie u vyšších eukaryot.....	23

6.1	Buněčná smrt.....	23
6.2	Lidské patologie.....	23
7	Závěr	24
	Seznam použité literatury	25

Abstrakt

Autofágie je evolučně konzervovaná degradativní dráha. V buňkách je běžně udržována na nízké hladině, kdy degraduje nadbytečné či poškozené organely a proteiny a tím se zásadně podílí na udržování buněčné homeostázy. Pokud jsou buňky vystavené nepříznivým podmínkám, například nedostatku živin nebo jiným druhům stresu, hladina autofágie se zvýší. V této fázi má především ochranou roli a pomáhá buňce v adaptaci na změnu podmínek. Autofágie je přísně regulována, její dysfunkce je spojována s mnoha lidskými onemocněními. Podrobné porozumění regulačním mechanismům autofágie může mít v budoucnu vliv při vývoji léčebných postupů chorob s ní spojených. Tato práce shrnuje poznatky o základních typech autofágie u kvasinek a popisuje, jak autofágie pomáhá adaptaci buňky na nepříznivé podmínky.

Klíčová slova: autofágie, kvasinky, degradační dráha, adaptace, TORC1

Abstract

Autophagy is an evolutionarily conserved degradative pathway. Autophagy occurs constitutively at a basal level and it is involved in the recycling and turnover of damaged or superfluous organelles and proteins. It has a critical role in cellular homeostasis. Autophagy can be induced in response to starvation or other types of stress. Induction of autophagy during these conditions has a major role in protection and adaptation of the cell. Autophagy needs to be properly regulated. A wide range of diseases is associated with dysregulation of autophagy. Better understanding of autophagy mechanisms can help to develop strategies designed to modulate autophagic responses occurring in a number of diseases. This work is focused on current knowledge of main types of autophagy and how autophagy helps yeast cells to adapt.

Key words: autophagy, yeast, degradative pathway, adaptation, TORC1

Seznam často používaných zkratk

ATG	autophagy related genes	geny související s autofágií
Cvt	cytoplasm-to-vacuole targeting	dráha cílená z cytoplasmy do vakuoly
EGO	escape from growth arrest	únik ze zastavení růstu
PAS	preautophagosomal structure phagophore assembly site	preautofagosomální struktura
PAK	protein kinase A	protein kináza A
TOR	target of rapamycin	cíl rapamycinu
TORC1	TOR complex 1	TOR komplex 1
UPR	unfolded protein response	odpověď na špatně sbalené proteiny
VPS	vacuolar protein sorting	dráha vakuolárního třídění proteinů

1 Úvod

Autofágie je konzervovaný degradativní proces uplatňující se ve všech eukaryotických buňkách. Hraje klíčovou roli v odstraňování nadbytečných a poškozených organel, ve vývoji buňky, v adaptaci na měnící se prostředí či při udržování buněčné homeostázy. Je známo několik forem autofágie, mezi tři základní formy se řadí chaperon-zprostředkovaná autofágie, mikroautofágie a makroautofágie (Mortimore, Hutson and Surmacz, 1983). Jednotlivé formy se liší především specifitou molekul určených k degradaci a samotným procesem degradace. Nejvíce studovanou formou je makroautofágie, při níž je část cytoplasmy spolu s proteiny a organelami určenými k degradaci obklopena dvojmembránovým veziklem zvaným autofagosom. Autofagosom následně fúzuje s lysosomy a náklad je degradován. Vzniklé makromolekuly jsou vypuštěny zpět do cytosolu a mohou být znovu využity (Dunn, 1990).

Jak mikroautofágie, tak makroautofágie mohou být selektivní nebo neselektivní. Neselektivní autofágie se uplatňuje především při nedostatku živin, kdy dochází k obratu cytoplasmy a znovuvyužití částí degradovaných molekul, zatímco specifická autofágie cílí na nadbytečné či poškozené organely. Příkladem specifické autofágie je mitofágie (Lemasters, 2005), pexofágie (Titorenko *et al.*, 1995) či retikulofágie (Bernales, McDonald and Walter, 2006). Cílem práce je shrnout dostupné poznatky o autofágii a jejím vlivu na schopnost adaptace kvasinkových buněk. V první části práce jsou představeny mechanismy a struktury účastníci se základních typů autofágie. Druhá část práce je zaměřena především na regulaci autofágie, signalizaci v souvislosti s dostupností živin a následnou odpověď kvasinkových buněk.

2 Typy autofágie u kvasinek

Autofágie se pravděpodobně vyvinula u jednobuněčných eukaryot jako obranný mechanismus pomáhající buňce přežít období nedostatku živin. V buňce je autofágie běžně udržována na základní hladině, kdy se podílí na udržování homeostázy vnitřního prostředí obratem cytoplasmy, proteinů a organel (Tsukada and Ohsumi, 1993). Pokud se zvýší nároky buňky na příjem energie, například při hladovění, dochází ke zvýšení hladiny autofágie. Autofágie se také uplatňuje v odpovědi na různé formy stresu, například stresu souvisejícího s endoplasmatickým retikulem či akumulací proteinových agregátů (Bernales, McDonald and Walter, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006). Pohlcení a degradace makromolekul vede k produkci nezbytných metabolických substrátů, které následně slouží při adaptaci na stresovou situaci. Autofágie tedy může generovat zdroje potřebné k produkci ATP či syntéze proteinů a mastných kyselin (Teter *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006).

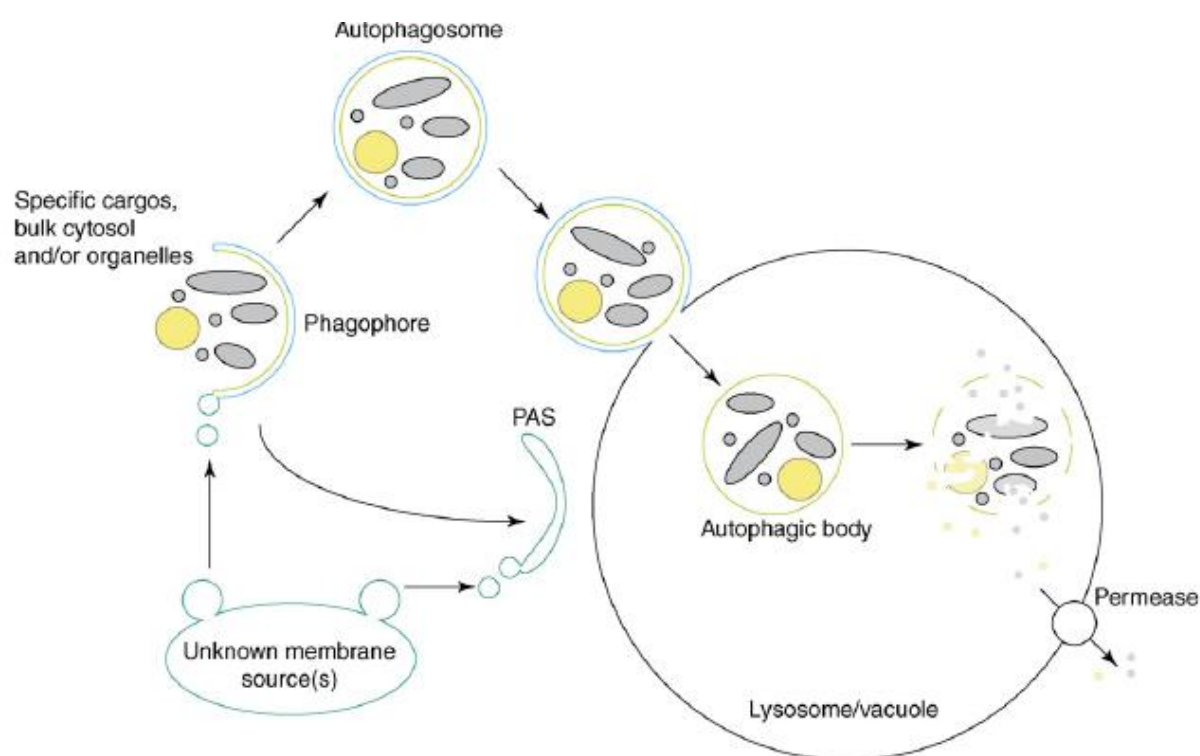
2.1 Mikroautofágie

Při mikroautofágii dochází k přímému obalení části cytoplasmy vakuolární membránou a její následné degradaci. V počátečních fázích mikroautofágie membrána vystupuje z povrchu vakuoly, děje se tak v oblastech s nízkým obsahem transmembránových proteinů. Dochází ke vzniku spontánně vzniklých prohlubní a jejich udržování, čímž narůstá tendence invaginace membrány (Müller *et al.*, 2000). Mikroautofágní invaginace jsou regulovány GTPázou Vps1p, která může způsobit jejich nárůst či zmenšení (Uttenweiler, Schwarz and Mayer, 2005). Frekvence invaginací závisí na dostupných živinách. Nedostatek živin indukuje iniciaci invaginace a její následné rozšíření v charakteristický trubicovitý tvar (Müller *et al.*, 2000), jehož formace je závislá na ATP (Sattler and Mayer, 2000). Díky vysoké hustotě lipidů v kombinaci s nízkou hustotou proteinů na povrchu trubicovitého útvaru přirozeně dochází k invaginaci a vytvoření mikroautofágního veziklu (Müller *et al.*, 2000). Vezikl je následně hydrolyzován v lumen vakuoly pomocí Atg15p a dalších hydroláz (Epple *et al.*, 2001).

2.2 Makroautofágie

Makrofágie je nejvíce studovanou formou autofágie u kvasinek. V počáteční fázi obklopování cytoplasmatického nákladu se uplatňuje fagofor (Dunn, 1990; Kirisako *et al.*, 1999). Jedná se o dvoumembránovou strukturu (viz. obrázek 1), která následně expanduje a uzavírá se, čímž vzniká autofagosom (Dunn, 1990). Iniciace nukleace fagoforu probíhá na perivakuolárním útvaru zvaném PAS. Většina základních komponent pro kvasinkovou autofágii je alespoň přechodně lokalizována v PAS (Suzuki *et al.*, 2001). Autofagosom je již

kompletní dvoumembránový útvar vznikající expanzí fagoforu, který obklopuje cytoplasmatický náklad během makroautofágie (Dunn, 1990). Struktura vázaná k vnitřní membráně, která je vypuštěna do lumen vakuoly poté, co vnější membrána autofagosomu fúzuje s vakuolární membránou, se nazývá autofagické tělísko (Baba, Osumi and Ohsumi, 1995). Jádro autofágie je tvořeno čtyřmi hlavními funkčními skupinami, mezi které patří komplex Atg1-Atg13-Atg17, komplex I fosfatidilinositol-3-kinázy třídy III skládající se z Vps34, Vps15, Atg6 a Atg14, dva ubiquitinové proteinové konjugační systémy a Atg 9 cyklický systém.



Obrázek 1: Přestavby membrány během autofágie. Po indukci autofágie dochází k formaci fagoforu vznikajícího z PAS, původ membrány účastnící se růstu fagoforu není zatím zcela znám. Poté dojde k obklopení části cytoplasmy včetně organel a vzniká autofagosom s dvěma membránami. Následně vnější membrána autofagosomu fúzuje s vakuolou a vnitřní jednomembránový vezikl, autofagické tělísko, je vypuštěn do lumen vakuoly. Pomocí hydroláz ve vakuole je náklad tělíska degradován. V posledním kroku autofágie jsou makromolekuly vzniklé degradací nákladu transportovány zpět do cytosolu a znovu využity. Převzato z (Yorimitsu and Klionsky, 2007)

2.2.1 Geny ATG, charakterizace a funkce Atg proteinů

Identifikace defektních mutant při studiích autofágie (Tsukada and Ohsumi, 1993; Thumm *et al.*, 1994), pexofágie (Sakai *et al.*, 1998) nebo Ctv dráhy (Harding *et al.*, 1995), provedených na modelu *Saccharomyces cerevisiae*, vedla k pojmenování účastníků se genů, dnes souhrně nazvaných ATG.

2.2.1.1 Atg1 kinázový komplex

Atg1 komplex se skládá z Atg1 proteinkinázy (Matsuura *et al.*, 1997), jejíž aktivita je esenciální pro indukci autofágie, Atg13 a Atg17 (Funakoshi *et al.*, 1997; Cheong *et al.*, 2005). Kinázová aktivita Atg1 je vyžadována pro formaci autofagosomu a Cvt dráhu. Delece genu *ATG1* má za následek blokaci jak Cvt dráhy, tak autofágie (Harding *et al.*, 1995; Matsuura *et al.*, 1997). Pro kinázovou aktivitu Atg1 je vyžadován Atg13, který je hyperfosforylován při dostatku živin a jehož fosforylace je regulována TOR komplexem I a PKA dráhou. Atg13 je rychle, ale pouze částečně defosforylován během indukce autofágie (Kamada *et al.*, 2010).

2.2.1.2 Atg9

Atg9 je transmembránový protein, který se pohybuje mezi PAS a Atg 9 rezervoáry, které jsou pokládány za místa, z nichž je membrána doručována do vznikajícího fagoforu. Přesná role Atg9 v tomto procesu není zcela jasná. Atg9 může interagovat sám se sebou nebo existovat v komplexu (Noda *et al.*, 2000; Mari *et al.*, 2010).

2.2.1.3 Kvasinkové PtdIns3K I a II komplexy

Vps34, fosfatidilinositol-3-kináza třídy III, specificky fosforyluje pozici 3 fosfatidilinositolu (Schu *et al.*, 1993). Výsledný produkt, fosfatidilinositol-3-fosfát (PI3P), je esenciální nejen pro formaci autofagosomu, ale také pro dráhu VPS (vacuolar protein sorting) u kvasinek (pro přehled viz. (Backer, 2008)). Pro funkci v těchto dvou procesech tvoří Vps34 dva odlišné komplexy. Prvním komplexem je fosfatidilinositol-3-kinázový komplex I, tvořený Vps34, Vps15, Vps30/Atg6, a Atg14, který se uplatňuje v autofágii. Druhým komplexem je fosfatidilinositol-3-kinázový komplex II, skládající se z Vps34, Vps15, Vps30, a Vps38, který se uplatňuje ve VPS dráze (Kihara *et al.*, 2001; Obara *et al.*, 2006). Vysoká specifita komplexů je určena přítomností proteinů Atg14 a Vps38, které asociují výhradně s komplexy I nebo II. Atg14 a Vps38 dále hrají roli při spojování Vps30 a Vps34 při tvorbě komplexu. Atg14 je vyžadován pro lokalizaci komplexu I v PAS, zatímco Vps38 je zodpovědný za endozomální lokaci komplexu II (Obara *et al.*, 2006).

2.2.1.4 Kvasinkové ubiquitinové konjugací systémy

Autofágie se účastní dva konjugací systémy a to konjugací systém Atg8 (Ichimura *et al.*, 2000) a konjugací systém Atg12 (Mizushima *et al.*, 1998). Konjugací proteiny tvoří konjugací produkty Atg8-PE (Atg8-fosfatidylethanolamin) a Atg12-Atg5 (Ichimura *et al.*, 2000; Kirisako *et al.*, 2000) a účastní se expanze fagoforu. Konjugát Atg12-Atg5 spolu s Atg16 mohou usnadnit konjugaci Atg8 do PE. Počet Atg8 může regulovat velikost autofagosomu (Xie *et al.*, 2008). Atg8 zároveň hraje roli v navazování nákladu během selektivní autofágie (Shintani *et al.*, 2002).

2.3 Specifická autofágie

Přestože byla autofágie nejprve považována za neselektivní degradativní dráhu, může selektivně degradovat specifické organely nebo proteiny jako mitochondrie (Lemasters, 2005), peroxizomy (Titorenko *et al.*, 1995), ribosomy (Kraft *et al.*, 2008) či endoplazmatické retikulum (Bernales, McDonald and Walter, 2006). Dalším případem je organelově specifická autofágie, Ctv dráha (Harding *et al.*, 1995). Ctv dráha je typ selektivní autofágie pozorovaný pouze u kvasinek, při němž dochází k dodávání hydroláz Ams1 a Ape1 do vakuoly.

2.3.1 Mitofágie

Mitochondrie se podílí na mnoha metabolických procesech, během kterých přirozeně vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS způsobují oxidativní poškození mitochondriálních lipidů, DNA a proteinů. Mitofágie je jedním z mechanismů udržujících kvalitu a kvantitu mitochondrií (Twig *et al.*, 2008; Kurihara *et al.*, 2012). Přestože je mitofágie typem autofágie, není zcela jasné, zda spadá pod mikroautofágii nebo makroautofágii. Studie našly jak přímé invaginace vakuolární membrány obklopující mitochondrie, což naznačuje spojitost s mikroautofágií (Kiššova *et al.*, 2007), tak mitochondrie obsažené v autofagosomu (Kanki *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2009). Většina genů ATG esenciálních pro neselektivní autofágii je zároveň vyžadována pro mitofágii (Kiššová *et al.*, 2004; Kiššova *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

2.3.1.1 Proteiny účastníci se mitofágie

Gen *ATG32*, který kóduje protein Atg32 lokalizovaný na vnější mitochondriální membráně, byl identifikován jako nepostradatelný pro mitofágii. Delece *ATG32* kompletně inhibuje mitofágii, ale nemá efekt na Cvt cestu nebo pexofágii, což naznačuje, že se jedná o gen specifický pro mitofágii (Kanki *et al.*, 2009; Okamoto *et al.*, 2009). Atg11 je adaptorový cytosolický protein, který se účastní selektivní autofágie. *ATG11*, gen kódující protein Atg11, byl popsán jako esenciální pro Cvt dráhu (Harding *et al.*, 1995). Vzhledem k tomu, že Atg11

není vyžadován pro neselektivní autofágii (Kim *et al.*, 2001) a je esenciální pro Cvt dráhu (Harding *et al.*, 1995), byl považován za protein fungující při selekci nákladu (Kim *et al.*, 2001). Atg11 interaguje s receptory nákladu a odvádí ho do PAS (Shintani *et al.*, 2002). Interakce závislé na fosforylaci, jako je interakce Atg32-Atg11, byly identifikovány v dalších selektivních autofagických procesech (Pfaffenwimmer *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2014).

2.3.2 Retikulofágie

Vnitrobuněčný endomembránový systém, zahrnující mimo jiné endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex, je udržován dynamickým tokem membrány mezi jednotlivými celky. Obecně tento proces zahrnuje vypuštění membrány z donorové organely následované fúzí s akceptorem. Autofágie uplatňuje odlišné přestavby membrány. Pro vznik autofagosomu je důležitá správná funkce endoplazmatického retikula, což napovídá tomu, že endoplazmatické retikulum může být alespoň z části donorem membránových lipidů uplatňujících se v autofágii (pro přehled viz. (Reggiori, 2006)). Endoplazmatické retikulum řídí doručování proteinů přes sekreční cesty do místa určení. Proteiny procházející skrze endoplazmatické retikulum potřebují zaujmout správnou konformaci a mnoho proteinů zde zároveň podstupuje posttranslační modifikace či se skládá do komplexů. Mezi hlavní mechanismy kontrolující kvalitu těchto proteinů patří UPR (unfolded protein response) (Kaufman, 1999) a dráha ERAD (ER-associated degradation) (Bonifacino and Weissman, 1998). Pokud se však v endoplazmatickém retikulu hromadí špatně složené proteiny, které mohou narušovat jeho správnou funkci, může zároveň signalizovat indukci autofágie jako alternativního mechanismu pro udržování kvality proteinů (Bernales *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006). Ošetření kvasinek tunicamycinem nebo dithiothreitem (DTT), tedy látkami, které jsou používány k navození stresu v endoplazmatickém retikulu, indukuje autofágii (Bernales *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006).

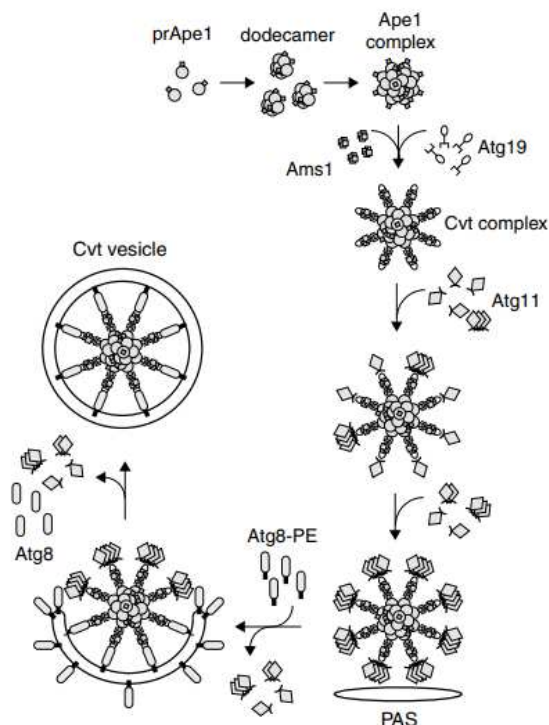
2.3.2.1 Proteiny účastnící se retikulofágie

Enzym Ire1 je konzervovaný transmembránový protein endoplazmatického retikula obsahující kinázovou doménu v cytosolickém segmentu (Cox, Shamu and Walter, 1993). Když Ire1 zaznamená akumulaci nesložených proteinů v lumen endoplazmatického retikula, je aktivován, aby odstranil intronovou sekvenci z *HAC1* mRNA. Sestřižená *HAC1* mRNA, kódující aktivní transkripční faktor, je účinně translatována, což vede ke stimulaci exprese UPR cílových genů (Cox and Walter, 1996). Úbytek Ire1 nebo Hac1, stejně jako úbytek proteinů Atg, blokuje autofágii indukovanou stresem endoplazmatického retikula. Tyto závěry naznačují, že Ire1-Hac1 signalizace se účastní indukce autofágie, aby pomáhala přežití

kvasinkových buněk během stresových podmínek (Bernales *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006). Jestli a jak je signál z endoplazmatického retikula spojený s TOR signalizací, není zatím zcela jasné. V kvasinkách TOR dráha reguluje asociaci mezi komponenty Atg1 kinázového komplexu, což může hrát klíčovou roli v indukci autofágie. Atg1 kináza je také aktivovaná při stresu endoplazmatického retikula (Yorimitsu *et al.*, 2006).

2.3.3 Dráha Cvt

Autofágie u kvasinek se částečně překrývá se specifickou biosyntetickou Cvt dráhou. Vzhledem k podobnosti s autofagií je dráha Cvt považována za selektivní typ autofágie. Cvt dráha dodává hydrolázy alfa-manosidázu (Ams1) a aminopeptidázu I (Ape1) do vakuoly (viz. obrázek 2). Ape1 je syntetizována v cytosolu jako proenzym. Cvt dráha odejme Ape1 prekursor do Cvt veziklu v PAS a dopraví ho do vakuoly, kde je aktivován odstraněním propeptidu (Harding *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1996; Shintani *et al.*, 2002). Autofágie je primárně využívána k degradaci a je indukována při hladovění. Oproti tomu dráha Cvt je biosyntetická a probíhá při dostatku živin. V obou případech je základním mechanismem oddělení části cytosolu dvoumembránovým veziklem (Baba *et al.*, 1997).



Obrázek č. 2: Tvorba Cvt veziklu. Prekurzor Ape1 je proenzym syntetizovaný v cytosolu. Receptorový protein Atg19 se váže na Ape1 komplex, čímž vzniká Cvt komplex. Atg11 se naváže na Atg9 a transportuje Cvt komplex do PAS, kde se komplex Cvt naváže na rostoucí fagofor skrze interakci mezi Atg19 a Atg8-PE. Membrána fagoforu expanduje okolo komplexu Cvt a vzniká Cvt vezikl. Převzato z (Yorimitsu and Klionsky, 2005)

3 Role monomerních GTP-vazebných proteinů v autofágii

Procesy zahrnující dělení buňky, organizaci cytoskeletu a transkripci jsou řízeny mimo jiné různými členy z rodiny monomerních guanin-vazebných proteinů. Ras podrodina proteinů reguluje buněčný cyklus a dělení (Cooper, Aktas and Cai, 1997). Proteiny Ran pomáhají transportu RNA z jádra do cytosolu (Ren *et al.*, 1995). Rho podrodina, zahrnující Cdc42 a Rho proteiny, je zahrnuta v dynamice cytoskeletu a buněčném pohybu (pro přehled viz. (Symons, 1996)). Proteiny Rab a Arf/Arf1/Sar jsou vyžadovány pro vnitrobuněčné dopravování veziklů. Proteiny Rab/Ypt obecně fungují v interakci veziklů s cílovou membránou, zatímco proteiny Arf/Arf1/Sar obecně fungují při pučení veziklů z původních membránových kompartmentů (Nuoffer and Balch, 1994; Novick and Zerialt, 1997).

3.1.1 Iniclace autofágie

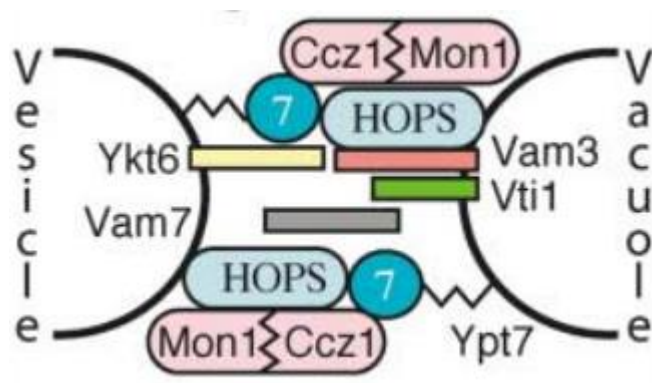
Autofágie je u kvasinek regulována především TORC1 a PKA dráhou. Kvasinkový monomerní GTP vazebný protein Ras2 reguluje autofágii skrze PKA dráhu. V aktivní formě s navázaným GTP se Ras2 nachází v plasmatické membráně, kde aktivuje adenylát cyklázu a tím zvyšuje produkci cAMP (Broek *et al.*, 1985). Tímto způsobem tvoří centrální kontrolní mechanismus metabolismu kvasinek a ovlivňuje mnoho buněčných aktivit včetně sporulace, filamentárního růstu a autofágie (Gimeno *et al.*, 1992; Budovskaya *et al.*, 2004). Ras2 ovlivňuje autofágii negativně, pokud nemůže dojít k hydrolýze GTP na GDP, dochází ke kompletní blokaci autofágie, podobně jako při delecí ATG1 genu kódujícího serin/threoninovou kinázu vyžadovanou pro formaci veziklu. Potlačení aktivity Ras2 vede k indukci autofágie i v podmínkách, kdy je dostatek živin. Navíc Ras2 s navázaným GTP snižuje počet autofagosomů akumulujících se v cytosolu, což naznačuje, že Ras s navázaným GTP inhibuje formaci autofagosomu (Budovskaya *et al.*, 2004).

3.1.2 Tvorba autofagosomu

Transmembránový protein Atg9 se účastní dodávání veziklů do PAS během formace autofagosomu (Yamamoto *et al.*, 2012). Proces dodávání veziklů do PAS je dále zprostředkován několika monomerními GTP vazebnými proteiny. V kvasinkových buňkách Atg9 spolupracuje s Ypt1, který se podílí na přesunu membrán z endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Ypt1 hraje zásadní roli ve formaci fagoforu. Ypt1 s navázaným GTP řídí dodávání veziklů do cílové membrány spolu se specifickými SNARE proteiny. Aktivní Xpt1 s navázaným GTP interaguje s Atg1 a tato interakce může být zvýšena rapamycinem. Ypt1 zřejmě řídí připoutání Atg9 veziklů skrze regulaci doručování Atg1 do PAS (Wang *et al.*, 2013).

3.1.3 Fúze autofagosomu a vakuoly

Po expanzi a formaci autofagosomu fúzuje autofagosom s vakuolou (viz. obrázek 3). Pro tento proces je esenciální monomerní GTP vazebný protein Ypt7. Aktivovaný Ypt7 se nachází v membráně jak pozdního endosomu, tak vakuoly. Příchod HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) komplexu do pozdního endosomu obsahujícího SNARE protein Vam7 (Bröcker *et al.*, 2012) orientuje pozdní endosom blízko vakuoly. Poté cílový Vam7 na povrchu pozdního endosomu naváže Vam3 a dojde k vytvoření komplexu (Sato, Darsow and Emr, 1998). Vam7-Vam3 komplex se naváže na Nyv1 lokalizovaný na povrchu vakuolární membrány. Výsledný komplex řídí fúzi pozdního endosomu a vakuoly (Ungermann, Price and Wickner, 2000). Během autofágie je Ypt7 vyžadován pro fúzi autofagosomu a vakuoly. Mechanismus je podobný jako při obecné fúzi veziklu a vakuoly. Delece YPT7 a narušení Vam7/Vam3, stejně jako HOPS komplexu, v podmínkách s nedostatkem živin způsobí hromadění autofagosomů v cytoplasmě, což dokládá neschopnost autofagosomu fúzovat s vakuolou (Darsow, Rieder and Emr, 1997; Kirisako *et al.*, 1999).



Obrázek č. 3: Schéma fúze autofagosomu a vakuoly. Převzato z (Levine and Klionsky, 2004).

4 Regulace autofágie

4.1 Epigenetická regulace

Na kontrole autofágie se podílí epigenetické modifikace zahrnující metylaci a acetylaci či deacetylaci histonu H3 a H4 (Dou *et al.*, 2005). Například spermidine, přírodní polyamin indukující autofágii, může způsobit deacetylaci histonu H3 represí histon acetyltransferázy, což vede ke komplexní hypoacetylaci u kvasinky (Eisenberg *et al.*, 2009). TOR signalizace může pozitivně regulovat acetylaci Lys56 histonu H3 (H3K56ac), tudíž po přidání rapamycinu, inhibitoru TOR dráhy, dochází ke snížení hladiny H3K56ac (Chen *et al.*, 2012). Při stimulaci autofágie dochází ke společné redukci H4K16ac a H3K4me3. Různé modifikace histonů pravděpodobně hrají roli v regulaci genové exprese ATG (Füllgrabe *et al.*, 2013).

4.2 Transkripční regulace

Proteiny Atg hrají nezbytnou roli ve vzniku autofagosomů správné velikosti (Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007). Zvýšení *ATG8* mRNA transkriptů během nedostatku živin odpovídá zvýšení hladiny Atg8 proteinů. Kvasinky deficientní na Atg8 tvoří abnormálně malé autofagosomy, což naznačuje, že transkripční kontrola, především ATG8, je důležitá během regulace autofágie (Kirisako *et al.*, 1999; Abeliovich *et al.*, 2000; Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007). Níže je popsáno několik proteinů, které byly identifikovány jako transkripční regulátory ovlivňující různé ATG geny.

4.2.1 Ume6 a *ATG8*

Ume6 je kvasinkový DNA vazebný protein, který se účastní represe transkripce v závislosti na korepresoru Sin3 a histon deacetyláze Rpd3. Touto cestou může docházet k negativní regulaci množství kvasinkových genů (David and Kevin, 1997; Laherty *et al.*, 1997). Delece *UME6*, *SIN3* a/nebo *RPD3* má za následek značné zvýšení *ATG8* mRNA během růstu buňky. Ume6 deficientní buňky tvoří větší autofagosomy než běžné buňky. Ume6 se jako negativní regulátor váže na promotor *ATG8*, negativně reguluje autofágii na transkripční úrovni, zatímco při autofágii-indukujících podmínkách fosforylace Ume6 uvolní represi transkripce *ATG8* (Bartholomew *et al.*, 2012). Dále se regulace účastní kináza Rim15, pozitivní regulátor autofágie, který spojuje signály z TOR a PKA dráhy (Pedruzzi *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2008).

4.2.2 Rph1 a ATG7

Podobně jako Ume6 je Rph1 DNA vazebný protein, který reguluje autofágii skrze expresi ATG genů (Jang, Wang and Sancar, 1999; Liang, Wang and Lo, 2013). V podmínkách s dostatkem živin Rph1 inhibuje transkripci několika ATG genů navázáním na promotor ATG7. Rph1 dependentní regulace exprese ATG7 hraje roli v regulaci autofágie (Bernard, Jin, González-Rodríguez, *et al.*, 2015).

4.2.3 Pho23 a ATG9

Pho23 spolu s histon deacetylázou Rpd3 reguluje genovou expresi u kvasinkových buněk (Loewith *et al.*, 2001). Jedná se o další faktor, který negativně reguluje mRNA a hladinu proteinů několika ATG genů, včetně ATG1, ATG7, ATG8, ATG9 a ATG14. Pho23 má vliv hlavně na expresi ATG9, přičemž množství jeho produktu koreluje s počtem autofagosomů. Po indukci autofágie buňky deficientní na Pho23 generují více autofagosomů normální velikosti v porovnání s normálními buňkami. Pho23 tedy může být důležitým transkripčním represorem autofágie, který se účastní frekvence tvorby autofagosomů skrze negativní regulaci hladiny Atg9 (Jin *et al.*, 2014).

4.2.4 Další transkripční regulátory

Krom Ume6, Rph1 a Pho23, byly identifikovány další jak pozitivní, tak negativní transkripční regulátory. Po hladovění buňky je exprese ATG7, ATG8, ATG9, ATG29 a ATG32 snížena v buňkách postrádajících Gln3 nebo Gat1 (Bernard, Jin, Xu, *et al.*, 2015). TOR může fosforylovat Gln3 a Ure2, což vede k zadržování Gln3 v cytosolu, čímž dochází k negativní regulaci autofágie (Feller *et al.*, 2006). Spt10 potlačuje expresi ATG8 a ATG9. Fyv5 má negativní efekt na expresi ATG1, ATG8, ATG9 a ATG14. Mezi pozitivní regulátory exprese ATG genů patří například Gcn4, který se přímo váže na promotor ATG1 a je vyžadován pro regulaci po nedostatku dusíku (Bernard, Jin, Xu, *et al.*, 2015).

4.3 Posttranslační modifikace

Autofágie je regulována třemi hlavními typy posttranslačních modifikací, a to fosforylací, ubiquitinací a acetylací. Tyto modifikace mohou regulovat funkci Atg proteinů nebo jiných regulačních faktorů.

4.3.1 Fosforylace

Fosforylace je nejlépe charakterizovanou posttranslační modifikací. Příkladem je regulace Atg1 kinázového komplexu, který se účastní indukce autofágie a je negativně regulován TOR (Kamada *et al.*, 2000). Dalším příkladem regulace fosforylací je modifikace Atg29 a Atg31 proteinů, které jsou důležité pro zformování aktivního Atg17-Atg31-Atg29

komplexu (Mao *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015). Atg9 fosforylace Atg1 kinázou je vyžadována v raných krocích autofágie, fosforylovaný Atg9 přivádí Atg8 a Atg18 do PAS (Papinski *et al.*, 2014). Fosforylace Atg19, Atg36 a fosforylace Atg32 na pozici Ser114 se účastní selektivních typů autofágie (Aoki *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2014). Dalším příkladem fosforylace jako posttranslační modifikace ovlivňující autofágii je PtdIns3K komplex I III. třídy, který hraje roli v nukleární fázi autofágie (Schu *et al.*, 1993).

4.3.2 Acetylce

Dalším faktorem účastnícím se regulace autofágie v kvasinkových buňkách je Esa1, katalytická podjednotka NuA4 histon acetyltransferázy (Yi *et al.*, 2012). Během nedostatku živin se acetylce Atg3 zvyšuje. Acetylce Lys19 a Lys48 na Atg3 jsou kritické modifikace pro autofágii. Represe těchto acetylací blokuje interakci Atg8-Atg3 (Hamai and Codogno, 2012; Yi *et al.*, 2012).

5 Odpověď kvasinkových buněk na dostupnost živin

Kvasinky jsou schopny přizpůsobit růst dostupnosti živin. Mohou zapojit alternativní metabolické cesty v závislosti na konkrétních okolnostech. Mezi tyto cesty patří například rychlý mitotický růst na bohatém médiu, filamentární růst v omezených podmínkách či navození sporulace při extrémním hladovění. Živiny tedy mají zároveň signalizační funkci určující metabolickou aktivitu. Autofágie citlivě reaguje na stav buňky ovlivněný dostupností živin. Signál je přenášen především skrze TORC1 a PKA dráhu (Soulard *et al.*, 2010; Kamada *et al.*, 2010).

5.1 Kináza TOR

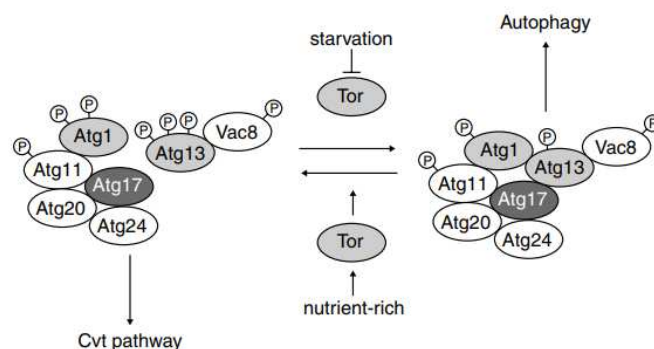
TOR je vysoce konzervovaná serein/threoninová protein kináza, která hraje ústřední roli v buněčném růstu a metabolismu eukaryotních organismů. Název komplexu je odvozen od rapamycinu, sekundárního produktu organismu *Streptomyces hygroscopicus*, který cílí právě na TOR proteiny (Sehgal *et al.*, 1975; Vézina *et al.*, 1975). Studie zabývající se TOR nejprve identifikovaly protein FKBP, následně díky selekci mutant rezistentních k rapamycinu byly objeveny další účastníci se proteiny Tor1 a Tor2 (Heitman *et al.*, 1991). V kvasinkách jsou přítomny dva geny TOR, jejichž proteiny jsou součástí dvou komplexů TORC1 a TORC2. Komplex TORC1 je specificky inhibován rapamycinem a v závislosti na dostupnosti živin reguluje buněčný růst. Komplex TORC2 je necitlivý k rapamycinu a reguluje polymerizaci aktinu, syntézu sfingolipidů a endocytózu (Loewith *et al.*, 2002).

5.1.1 Komplex TORC1

TORC1 komplex se skládá z Kog1, Lst8, Tco89 a Tor1 nebo Tor 2 (Loewith *et al.*, 2002; Reinke *et al.*, 2004). Cílení Kog1, Tco89, Lst8 a TOR1 pomocí GFP vedlo k lokalizaci TORC1 komplexu ve vakuolární membráně (Urban *et al.*, 2007; Sturgill *et al.*, 2008; Berchtold and Walther, 2009). Zároveň je však možné, že se části komplexu TORC1 mohou nacházet i jinde v buňce, například Tor1 se podílí na regulaci transkripce 35S rRNA (Li *et al.*, 2006). Rapamycin ovlivňuje fyziologii kvasinek stejně jako nedostatek živin (Barbet *et al.*, 1996). Hladovění i vystavení buněk účinkům rapamycinu vede k poklesu syntézy proteinů, indukci autofágie a vstupu do G0 fáze buněčného cyklu. V buňkách vystavených nedostatku uhlíku, dusíku, fosfátu nebo aminokyselin, stejně jako v buňkách vystavených účinku rapamycinu, dochází k defosforylaci Sch9, substrátu TORC1 (Urban *et al.*, 2007; Binda *et al.*, 2009). Zároveň je dramaticky snížena fosforylace Sch9 v buňkách vystavených různým formám stresu, jako jsou vysoká koncentrace soli, redoxní stres, přesun do vyšší teploty či kofein (Kuranda *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2007).

5.1.2 TORC1 a vztah k autofágii

Regulace TOR signalizací se uplatňuje na úrovni iniciace autofágie. TORC1 reguluje autofágii skrze Atg1 kinázový komplex, který je vyžadován pro indukci autofágie (viz. obrázek 4). Pokud je TORC1 aktivní, Atg13 je hyperfosforylován, pravděpodobně přímo TORC1, a tím je zabráněno asociaci Atg13 s Atg1, Atg17, Atg31 a Atg29 (Yorimitsu *et al.*, 2009; Kamada *et al.*, 2010). Inhibice TORC1 vede k defosforylaci Atg13, vzniku Atg1 proteinkinázového komplexu, fosforylaci a aktivaci Atg1 (Kijanska *et al.*, 2010; Yeh, Wrasman and Herman, 2010). Exprese nefosforylovatelné verze Atg13 vede k indukci autofágie v buňkách rostoucích na bohatém médiu, což vede k závěru, že defosforylace Atg13 samotná je dostačující pro iniciaci autofágie (Kamada *et al.*, 2010).



Obrázek č. 4: Schéma regulačního komplexu pro indukci autofágie. Kináza Tor reguluje indukci autofágie na základě dostupnosti živin. Kináza Atg1, která je esenciální pro autofágii i Cvt dráhu, tvoří komplex s několika proteiny, které se účastní především autofágie (vyznačeny tmavě) a Cvt dráhy (vyznačeny světle). Při dostatku živin je Tor kináza aktivní a protein Atg13 je hyperfosforylován, což negativně reguluje autofágii. Během nedostatku živin je Tor inaktivní, Atg13 je hypofosforylován a následné formace proteinových komplexů vedou k indukci autofágie. Převzato z (Yorimitsu and Klionsky, 2005).

5.1.3 EGO komplex

Při nepříznivých vnějších podmínkách se buňky přestávají dělit, dochází ke zpomalení metabolismu, akumulaci energetických zásob a indukci exprese proteinů odpovídajících na stresové podmínky. Tento metabolicky aktivní stav, při kterém ale nedochází k dělení buňky, se označuje jako fáze G0. Pro objasnění jak dochází k obnovení růstu buněk z G0 fáze, byly identifikovány mutanty neschopné uniknout z rapamycinem navozené zástavy buněčného cyklu (Dubouloz *et al.*, 2005). Tato a následná studie identifikovaly EGO komplex jako významný regulátor TORC1 (Binda *et al.*, 2009). EGO komplex se stejně jako TORC1 nachází vakuolární membráně a může hrát roli v předávání signalizace ve vztahu k aminokyselinám TORC1 (Binda *et al.*, 2009). Studie naznačují, že EGO komplex může jak pozitivně, tak negativně regulovat TORC1 (Binda *et al.*, 2009), avšak způsob, kterým k ovlivňování aktivity TORC1 dochází není zcela jasný.

5.2 PKA

Dalším faktorem, který se účastní signalizace na základě dostupnosti živin a ovlivňuje několik buněčných procesů včetně transkripce, translace, buněčné morfogeneze a autofágie, je cAMP-dependentní protein kináza A (PKA). Spolu s TOR dráhou tvoří dvě hlavní signální dráhy regulující buněčný cyklus (Soulard *et al.*, 2010; Kamada *et al.*, 2010). Inhibice PKA signalizace je dostatečná pro indukci autofágické aktivity a to nezávisle, nebo paralelně s TOR dráhou. Například obě dráhy ovlivňují Atg13, klíčový regulátor protein kinázové aktivity Atg1,

ale zřejmě ovlivňují rozdílná fosforylační místa na proteinu. Data naznačují, že jak PKA tak TOR dráha jsou důležité, ale nezávislé regulátory autofágie, a že Atg1 protein kinázový komplex je klíčovým signálním bodem mezi těmito dvěma cestami (Stephan *et al.*, 2009).

5.3 Regulace autofágie dostupností aminokyselin

Pro zjištění, zda dochází k indukci autofágie na základě poklesu hladiny živin uvnitř buňky, nebo zda je indukce autofágie následkem změn v extracelulárním prostředí, byla provedena analýza pro specifické aminokyseliny. Výsledky ukázaly, že určité znaky autofágie mohou být indukovány nezávisle na dostupnosti aminokyselin ve vnějším prostředí. Tento typ autofágie závisí na protein kináze Gcn2, která funguje jako senzor vnitrobuněčné dostupnosti aminokyselin (Ecker *et al.*, 2010). U kvasinkových buněk je makroautofágie indukována mimo jiné nedostatkem dusíku (Tsukada and Ohsumi, 1993). Při absenci vnějšího zdroje dusíku může buňka díky autofágii, která umožňuje recyklaci vnitřních zdrojů dusíku, dále pokračovat v metabolismu. Role autofágie v recyklaci dusíku byla podpořena zjištěním, že protein Atg22, kterému byla původně přiřazována role v autofágii, funguje jako transportér pro aktivní vypuzování aminokyselin z lumen vakuoly. Při absenci zdroje dusíku dochází u Atg22 deficientních buněk ke ztrátě životnosti, protože aminokyseliny uvolňované při autofágii degradaci proteinů ve vakuolárním lumen nejsou transportovány do cytosolu v dostatečném množství (Yang *et al.*, 2006).

6 Autofágie u vyšších eukaryot

V kvasinkových buňkách autofágie funguje především jako mechanismus pro přežití během nepříznivých podmínek, například při nedostatku živin. Avšak v mnohobuněčných organismech se autofágie účastní širokého spektra procesů. Kromě uplatnění během nedostatku živin hraje roli v programované buněčné smrti a je spojována s různými typy onemocnění, především nervových onemocnění a myopatií.

6.1 Buněčná smrt

Autofágie se uplatňuje v rozdílných typech buněčné smrti. Například eliminace tkáně slinných žláz během vývoje *Drosophila melanogaster* vykazuje apoptotické rysy jako je fragmentace DNA, ale také masivní akumulaci lysosomálních vezikul (von Gaudecker and Schmale, 1974; Jiang, Baehrecke and Thummel, 1997; Lee and Baehrecke, 2001). Autofágie se může účastnit buněčné smrti i nezávisle na apoptóze (Bursch *et al.*, 1996; Xiang, Chao and Korsmeyer, 1996; Saeki *et al.*, 2000).

6.2 Lidské patologie

Několik typů onemocnění, zahrnující především nervové a svalové patologie, infekční nemoci či určité typy rakoviny, je spojováno s disfunkcí autofágie. Autofágie může přispívat k eliminaci intracelulárních proteinových agregátů, například agregáty huntingtinu a alfa-synucleinu způsobené nadměrnou expresí mutantních forem těchto proteinů, jsou účinně odstraňovány z buněk ošetřených rapamycinem, tedy látkou indukující autofágii, zatímco při ošetření 3-methyladeninenem, inhibitorem autofágie, je odstraňování agregátů redukováno (Qin *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003). Autofágie hraje roli i při nádorových onemocněních, předpokládá se, že v nádorových buňkách dochází k jejímu utlumení. Buněčné linie odvozené z nádorů jater, pankreatu a prsu vykazují nízkou hladinu autofágie v porovnání s normálními buňkami stejného původu (Schwarze and Seglen, 1985; Kisen *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1999). Přesto je u některých nádorových buněčných linií autofágie udržována na vysoké hladině (Mitchener *et al.*, 1976; Seglen, Munthe-kaas and Dybedal, 1984). Některé viry a bakterie využívají proces autofágie k invazi do hostitelské tkáně (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Suhy, Giddings and Kirkegaard, 2000; Prentice *et al.*, 2004), avšak indukce autofágie může být i obranným mechanismem při snaze zabránit virové infekci (Liang *et al.*, 1998; Talloczy *et al.*, 2002).

7 Závěr

Autofágie je obecně vysoce regulovaná a komplikovaná dráha, která se účastní vnitrobuněčných degradativních procesů jak specifických, tak nespecifických. Hlavní funkcí autofágie u kvasinkových buněk je pravděpodobně schopnost adaptace buněk při nepříznivých podmínkách umožňující jejich přežití. Pokud jsou buňky vystaveny nedostatku živin, dochází k degradaci a následnému využití makromolekul. Autofágie umožňuje adaptaci buňky na různé formy stresu, například se účastní odbourávání špatně složených proteinů, jejichž hromadění může mít pro buňku fatální následky. Regulace autofágie probíhá na několika úrovních, mimo jiné epigeneticky, transkripčními regulátory nebo posttranslačními modifikacemi. Autofágie je zároveň vysoce spjata s dostupností živin. Signalizaci a odpověď buňky na dostupnost živin řídí dvě hlavní dráhy, TOR a PKA. Mnoho otázek zůstává stále nejasných, jednou z hlavních je detailní mechanismus vzniku autofagosomu. Membrána autofagosomu pravděpodobně pochází z více zdrojů, které mohou spolupracovat, nebo přispívat různým formám autofágie. Další otevřenou otázkou zůstává detailní regulace autofágie jak u modelových organismů, tak u vyšších eukaryot. Autofágie je konzervovaná od kvasinek po vyšší eukaryota, účastní se několika typů buněčné smrti a její disfunkce je spojována s několika lidskými patologiemi. Porozumění regulaci této dráhy může být v budoucnu využito při léčbě různých lidských onemocnění.

Seznam použité literatury

- Abeliovich, H., Dunn, W.A., Kim, J., Klionsky, D.J. (2000) 'Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps', *Journal of Cell Biology*, 151(5), pp. 1025–1033.
- Alexandre, S., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., Jenö, P., Hall, M.N. (2010) 'The Rapamycin-sensitive Phosphoproteome Reveals That TOR Controls Protein Kinase A Toward Some But Not All Substrates', *Molecular Biology of the Cell*, 21, pp. 3475–3486.
- Aoki, Y., Kanki, T., Hirota, Y., Kurihara, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D. (2011) 'Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy', *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), pp. 3206–3217.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., Ohsumi, Y. (1997) 'Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome', *Journal of Cell Biology*, 139(7), pp. 1687–1695.
- Baba, M., Osumi, M., Ohsumi, Y. (1995) 'Analysis of the Membrane Structures Involved in Autophagy in Yeast by Freeze-Replica Method.', *Cell Structure and Function*, 20(6), pp. 465–471.
- Backer, J. M. (2008) 'The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34', *Biochemical Journal*, 410(1), pp. 1–17.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., Hall, M.N. (1996) 'TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast.', *Molecular biology of the cell*, 7(1), pp. 25–42.
- Bartholomew, C. R., Suzuki, T., Du, Z., Backues, S. K., Jin, M., Lynch-Day, M. A., Umekawa, M., Kamath, A., Zhao, M., Xie, Z., Inoki, K., Klionsky, D. J. (2012) 'Ume6 transcription factor is part of a signaling cascade that regulates autophagy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), pp. 11206–11210.
- Berchtold, D. and Walther, T. C. (2009) 'TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain', *Molecular Biology of the Cell*, 20, pp. 1565–1575.
- Bernales, S., McDonald, K. L. and Walter, P. (2006) 'Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response', *PLoS Biology*, 4(12), pp. 2311–2324.
- Bernard, A., Jin, M., Xu, Z., Klionsky, D.J. (2015) 'A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy', *Autophagy*, 11(11), pp. 2114–2122.
- Bernard, A., Jin, M., González-Rodríguez, P., Füllgrabe, J., Delorme-Axford, E., Backues, S.K., Joseph, B., Klionsky, D.J. (2015) 'Rph1/KDM4 mediates nutrient-limitation signaling that leads to the transcriptional induction of autophagy', *Current Biology*, 25(5), pp. 546–555.
- Binda, M., Péli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., De Virgilio, C. (2009) 'The Vam6 GEF Controls TORC1 by Activating the EGO Complex', *Molecular Cell*, 35(5), pp. 563–573.

Bonifacino, J. S. and Weissman, M. (1998) 'Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways.', *Annual review of cell and developmental biology*, 14, pp. 19–57.

Bröckera, C., Kuhleeb, A., Gatsogiannis, Ch., Balderhaara, H.J., Hönschera, C., Engelbrecht-Vandréa, S., Ungermanna, Ch., Raunser, S. (2012) 'Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), pp. 1991–1996.

Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J., Wigler, M. (1985) 'Differential Activation of Yeast Adenylate Cyclase by Wild-Type and Mutant', *Cell*, 41(July), pp. 763–769.

Budovskaya, Y.V., Stephan, J.S., Reggiori, F., Klionsky, D.J., Herman, P.K. (2004) 'The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp. 20663–20671.

Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Torok, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R., Hermann, R.S. (1996) 'Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy *', *Carcinogenesis*, 17(8), pp. 1595–1607.

Cooper, G. M., Aktas, H., Cai, H. (1997) 'Ras Links Growth Factor Signaling to the Cell Cycle Machinery via Regulation of Cyclin D1 and the Cdk Inhibitor p27 KIP1', *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), pp. 3850–3857.

Cox, J. S., Shamu, C. E., Walter, P. (1993) 'Transcriptional Induction of Genes Encoding Endoplasmic-Reticulum Resident Proteins Requires a Transmembrane Protein-Kinase', *Cell*, 73(6), pp. 1197–1206.

Cox, J. S. and Walter, P. (1996) 'A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response.', *Cell*, 87(3), pp. 391–404.

Darsow, T., Rieder, S. E., Emr, S. D. (1997) 'A Multispecificity Syntaxin Homologue, Vam3p, Essential for Autophagic and Biosynthetic Protein Transport to the Vacuole', *The Journal of Cell Biology*, 138(3), pp. 517–529.

David, K., Kevin, S. (1997) 'Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters', *Cell*, 89(3), pp. 365–371.

Dou, Y., Milne, T.A., Tackett, A.J., Smith, E.R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C.D., Chait, B.T., Hess, J.L., Roeder, R.G. (2005) 'Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF', *Cell*, 121(6), pp. 873–885.

Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Camerini, E., De Virgilio, C. (2005) 'The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast', *Molecular Cell*, 19(1), pp. 15–26.

Dunn, W. A. J. (1990) 'Studies on the mechanisms of autophagy: Maturation of the vacuole', *Journal of cell biology*, 110(June), pp. 1935–1945.

- Ecker, N., Mor, A., Journo, D., Abeliovich, H. (2010) 'Induction of autophagic flux by amino acid deprivation is distinct from nitrogen starvation-induced macroautophagy', *Autophagy*, 6(7), pp. 879–890. doi: 10.4161/auto.6.7.12753.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, Ch., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, Ch., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstien, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K.U., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G., Madeo, F. (2009) 'Induction of autophagy by spermidine promotes longevity', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 1305–1314.
- Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., Thumm, M. (2001) 'Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole', *Journal of Bacteriology*, 183(20), pp. 5942–5955.
- Feller, A., Boeckstaens, M., Marini, A.M., Dubois, E. (2006) 'Transduction of the nitrogen signal activating Gln3-mediated transcription is independent of Npr1 kinase and Rsp5-Bul1/2 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), pp. 28546–28554.
- Feng, W., Wu, T., Dan, X., Chen, Y., Li, L., Chen, S., Miao, D., Deng, H., Gong, X., Yu, L. (2015) 'Phosphorylation of Atg31 is required for autophagy', *Protein and Cell*, 6(4), pp. 288–296.
- Füllgrabe, J., Lynch-Day, M.A., Heldring, N., Li, W., Struijk, R.B., Ma, Q., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., Klionsky, D.J., Joseph, B. (2013) 'The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy', *Nature*, 500(7463), pp. 468–471.
- Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T., Ohsumi, Y. (1997) 'Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*', *Gene*, 192(2), pp. 207–213.
- Gaudecker, B., Schmale, E.-M. (1974) 'Substrate-Histochemical Investigations and Urahistochemical Demonstrations of Acid Phosphatase in Larval and Prepupal Salivary Glands of *Drosophila melanogaster* *', *Cell. Tiss. Res.*, 89, pp. 75–89.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. (1992) 'Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS', *Cell*, 68(6), pp. 1077–1090.
- Hamai A, Codogno P. (2012) 'New targets for acetylation in autophagy', *Sci Signal.*, 5(231).
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V., Klionsky, D.J. (1995) 'Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway', *Journal of Cell Biology*, 131(3), pp. 591–602.
- Harding, T.M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., Klionsky, D.J. (1996) 'Genetic and Phenotypic Overlap between Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway', 4(11), pp. 17621–17625.
- Heesun Ch., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis J.E., Wang, Ch., Klionsky D.J. (2005) 'Atg17 Regulates the Magnitude of the Autophagic Response', *Molecular biology of the cell*, 16(1), pp. 1–13.

Heitman, J., Movva, N., Hall, M. (1991) 'Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast', *Science*, 253(5022), pp. 905–909.

Chen, H., Fan, M., Pfeffer, L.M., Larabee, R.N. (2012) 'The histone H3 lysine 56 acetylation pathway is regulated by target of rapamycin (TOR) signaling and functions directly in ribosomal RNA biogenesis', *Nucleic Acids Research*, 40(14), pp. 6534–6546.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000) 'A ubiquitin-like system mediates protein lipidation', *Nature*, 408(6811), pp. 488–492.

Jang, Y. K., Wang, L., Sancar, G. B. (1999) 'RPH1 and GIS1 are damage-responsive repressors of PHR1.', *Molecular and cellular biology*, 19(11), pp. 7630–7638.

Jiang, C., Baehrecke, E. H., Thummel, C. S. (1997) 'Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis', *Development*, 124, pp. 4673–4683.

Jin, M., He, D., Backues, S.K., Freeberg, M.A., Liu, X., Kim, J.K., Klionsky, D.J. (2014) 'Transcriptional regulation by Pho23 modulates the frequency of autophagosome formation', *Current Biology*, 24(12), pp. 1314–1322.

Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., Ohsumi, Y. (2010) 'Tor Directly Controls the Atg1 Kinase Complex To Regulate Autophagy', *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), pp. 1049–1058.

Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., Klionsky, D.J. (2009) 'Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 17(1), pp. 98–109.

Kaufman, R. J. (1999) 'coordination of gene transcriptional and translational controls Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcriptional and translational controls', *Genes and Development*, 13, pp. 1211–1233.

Keisuke O., Sekito, T., Ohsumi, Y. (2006) 'Assortment of Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes—Atg14p Directs Association of Complex I to the Pre-autophagosomal Structure in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp. 1527–1539.

Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., Ohsumi, Y. (2001) 'Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Cell Biology*, 153(3), pp. 519–530.

Kijanska, M., Dohnal, I., Reiter, W., Kaspar, S., Stoffel, I., Ammerer, G., Kraft, C., Peter, M. (2010) 'Activation of Atg1 kinase in autophagy by regulated phosphorylation', *Autophagy*, 6(8), pp. 1168–1178

Kim, J., Kamada, Y., Stromhaug, P.E., Guan, J., Hefner-Gravink, A., Baba, M., Scott, S.V., Ohsumi, Y., Dunn, W.A., Klionsky, D.J. (2001) 'Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole', *Journal of Cell Biology*, 153(2), pp. 381–396.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., Ohsumi, Y. (1999) 'Formation Process of Autophagosome Is Traced with Apg8 / Aut7p in Yeast', *Jcb*, 147(2), pp. 435–446.

- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T. (2000) 'The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway', *Journal of Cell Biology*, 151(2), pp. 263–275.
- Kisen, G.T., Tessitore, L., Costelli, P., Gordon, P.B., Schwarze, P.E., Baccino, F.M., Seglen, P.O. (1993) 'Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells', *Carcinogenesis*, 14(12), pp. 2501–2505.
- Kiššová, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., Camougrand, N. (2007) 'Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast', *Autophagy*, 3(4), pp. 329–336.
- Kiššová, I., Deffieu, M., Manon, S., Camougrand, N. (2004) 'Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), pp. 39068–39074.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., Peter, M. (2008) 'Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease', *Nature Cell Biology*, 10(5), pp. 602–610.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J. (2006) 'Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways', *Molecular Microbiology*, 61(5), pp. 1147–1166.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D. (2012) 'Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast', *Journal of Biological Chemistry*, 287(5), pp. 3265–3272.
- Laherty, C.D., Yang, W.M., Jian-Min, S., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N. (1997) 'Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate Mad transcriptional repression', *Cell*, 89(3), pp. 349–356.
- Lee, C., Baehrecke, E. H. (2001) 'Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development', *Development*, 1455, pp. 1443–1455.
- Lemasters, J. J. (2005) 'Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging', *Rejuvenation Research*, 8(1).
- Levine, B., Klionsky, D. J. (2004) 'Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy', *Developmental Cell*, 6(4), pp. 463–477.
- Li, H., Tsang, Ch.K., Watkins, M., Bertram, P.G., Zheng, X.F.S. (2006) 'Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter', *Nature*, 442(7106), pp. 1058–1061.
- Liang, C.Y., Wang, L.C., Lo, W.S. (2013) 'Dissociation of the H3K36 demethylase Rph1 from chromatin mediates derepression of environmental stress-response genes under genotoxic stress in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular Biology of the Cell*, 24(20), pp. 3251–3262.

- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., Levine, B. (1998) 'Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein.', *Journal of virology*, 72(11), pp. 8586–8596.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B. (1999) 'Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1', *Nature*, 402(6762), pp. 672–676.
- Loewith, R., Smith, J.S., Meijer, M., Williams, T.J., Bachman, N., Boeke, J.D., Young, D. (2001) 'Pho23 Is Associated with the Rpd3 Histone Deacetylase and Is Required for Its Normal Function in Regulation of Gene Expression and Silencing in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), pp. 24068–24074.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., Hall, M.N. (2002) 'Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control', *Molecular Cell*, 10(3), pp. 457–468.
- Mao, K., Chew, L.H., Inoue-Aono, Y., Cheong, H., Nair, U., Popelka, H., Yip, C.K., Klionsky, D.J. (2013) 'Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), pp. E2875–E2884.
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D.J., Reggiori, F. (2010) 'An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis', *Journal of Cell Biology*, 190(6), pp. 1005–1022.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., Ohsumi, Y. (1997) 'Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*', *Gene*, 192(2), pp. 245–250.
- Mitchener, J.S., Shelburne, J.D., Bradford, W.D., Hawkins, H.K. (1976) 'Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells.', *The American journal of pathology*, 83(3), pp. 485–492.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y. (1998) 'A protein conjugation system essential for autophagy', *Nature*, 395(6700), pp. 395–398.
- Mortimore, G.E., Hutson, N.J., Surmacz, C.A. (1983) 'Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), pp. 2179–83.
- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., Mayer, A. (2000) 'Autophagic tubes: Vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding', *Journal of Cell Biology*, 151(3), pp. 519–528.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., Ohsumi, Y. (2007) 'Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion', *Cell*, 130(1), pp. 165–178.
- Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, Ch., Ohsumi, Y., Klionsky, D.J. (2000) 'Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways', *Journal of Cell Biology*, 148(3), pp. 465–479.

- Novick, P., Zerialt, M. (1997) 'The diversity of Rab proteins in vesicle transport', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 496–504.
- Nuoffer, C., Balch, W. E. (1994) 'GTPases : Multifunctional Molecular Switches Regulating Vesicular Traffic', *Annu. Rev. Biochem*, pp. 950–985.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y. (2009) 'Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 17(1), pp. 87–97.
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, Ch.A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., Lee, S.S., Brezovich, A., Lou, J.H., Turk, B.E., Aebersold, R., Ammerer, G., Peter, M., Kraft, C. (2014) 'Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase', *Molecular Cell*. The Authors, 53(3), pp. 471–483.
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., De Virgilio, C. (2003) 'TOR and PKA Signaling Pathways Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G0', *Molecular Cell*, 12(6), pp. 1607–1613.
- Pfaffenwimmer, T., Reiter, W., Brach, T., Nogellova, V., Papinski, D., Schuschnig, M., Abert, Ch., Ammerer, G., Martens, S., Kraft, C. (2014) 'Hrr25 kinase promotes selective autophagy by phosphorylating the cargo receptor Atg19', *EMBO reports*, 15(8), pp. 862–870.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L., Gorvel, J.P. (1998) 'Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments', *Infection and Immunity*, 66(5), pp. 2387–2392.
- Prentice, E., Jerome, W.G., Yoshimori, T., Mizushima, N., Denison, M.R. (2004) 'Coronavirus Replication Complex Formation Utilizes Components of Cellular Autophagy', *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), pp. 10136–10141.
- Qin, Z., Wang, Y., Kegel, K.B., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., Yoder, J., Aronin, N., Difiglia, M. (2003) 'Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments', *Human Molecular Genetics*, 12(24), pp. 3231–3244.
- Reggiori, F. (2006) 'Membrane Origin for Autophagy', *Current Topics in Developmental Biology*, 74(6), pp. 1–30.
- Reinke, A., Anderson, S., Mccaffery, J.M., Iii, J.Y., Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., Powers, T. (2004) 'TOR Complex 1 Includes a Novel Component , Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae* ', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15), pp. 14752–14762.
- Ren, M., Villamarin, A., Shih, A., Coutavas, E., Moore, M.S., Curcio, M.L.O., Clarke, V., Oppenheim, J.D., Eustachio, P.D., Rush, M.G. (1995) 'Separate Domains of the Ran GTPase Interact with Different Factors To Regulate Nuclear Protein Import and RNA Processing', *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), pp. 2117–2124.
- Saeki, K., Yuo, A., Okuma, E., Yazaki, Y., Susin, S.A., Kroemer, G., Takaku, F. (2000) 'Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic', *Cell Death and Differentiation*, pp. 1263–1269.

- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G., Subramani, S. (1998) 'Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates', *Cell*, 141(3), pp. 625–636.
- Sato, T. K., Darsow, T., Emr, S. D. (1998) 'Vam7p, a SNAP-25-Like Molecule, and Vam3p, a Syntaxin Homolog, Function Together in Yeast Vacuolar Protein Trafficking', *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), pp. 5308–5319.
- Sattler, T., Mayer, A. (2000) 'Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation', *Journal of Cell Biology*, 151(3), pp. 529–538.
- Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Morano, K.A., Noda, T., Ohsumi, Y., Klionsky, D.J. (1996) 'Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), pp. 12304–12308.
- Seglen, P.E.R., Munthe-kaas, A.M.Y.C., Dybedal, M.S. (1984) 'Amino Acid Control of Protein Degradation in Normal Leukemic Human Lymphocytes', *Experimental Cell Research*, 155, pp. 121–128.
- Sehgal, S. N., Baker, H., Vézina, C. (1975) 'Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.', *The Journal of antibiotics*, 28(10), pp. 727–732.
- Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., Klionsky, D.J. (2002) 'Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway', *Developmental Cell*, 3(6), pp. 825–837.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., Emr, S.D. (1993) 'Phosphatidylinositol 3-Kinase Encoded by Yeast VPS34 Gene Essential for Protein Sorting', *Science*, 260(April).
- Schwarze, P. E., Seglen, P. O. (1985) 'Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats', *Experimental Cell Research*, 157(1), pp. 15–28.
- S Stephan, J.S., Yeh, Y.Y., Ramachandran, V., Deminoff, S.J., Herman, P.K. (2009) 'The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), pp. 17049–17054.
- Sturgill, T.W., Cohen, A., Diefenbacher, M., Trautwein, M., Martin, D.E., Hall, M.N. (2008) 'TOR1 and TOR2 Have Distinct Locations in Live Cells', *Eukaryotic Cell*, 7(10), pp. 1819–1830.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., Kirkegaard, K. (2000) 'Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: an Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles', *Journal of Virology*, 74(19), pp. 8953–8965.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (2001) 'The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation', *EMBO Journal*, 20(21), pp. 5971–5981.

Symons, M. (1996) 'Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond', *Trends in biochemical sciences*, 4(96), pp. 178–181.

Talloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H.W., Leib, D.A., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Eskelinen, E.L., Levine, B. (2002) 'Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), pp. 190–195.

Tanaka, Ch., Tan, L.J., Mochida, K., Kirisako, H., Koizumi, M., Asai, E., Sakoh-Nakatogawa, M., Ohsumi, Y., Nakatogawa, H. (2014) 'Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins', *Journal of Cell Biology*, 207(1), pp. 91–105.

Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., Klionsky, D.J. (2001) 'Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase', *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), pp. 2083–2087.

Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., Wolf, D.H. (1994) 'Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*, 349(2), pp. 275–280.

Titorenko, V.I., Keizer, I., Harder, W., Veenhuis, M. (1995) 'Isolation and Characterization of Mutants Impaired in the Selective Degradation of Peroxisomes in the Yeast *Hansenula polymorpha*', *Journal of Bacteriology*, 177(2), pp. 357–363.

Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993) 'Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*, 333(1), pp. 169–174.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shrihail, O.S. (2008) 'Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy', *EMBO Journal*, 27(2), pp. 433–446.

Ungermann, C., Price, A., Wickner, W. (2000) 'A new role for a SNARE protein as a regulator of the Ypt7⁺ Rab-dependent stage of docking', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (lane 2), pp. 7–9.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., Virgilio, C.D., Hall, M.N., Loewith, R. (2007) 'Article Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*', *Molecular Cell*, pp. 663–674.

Uttenweiler, A., Schwarz, H., Mayer, A. (2005) 'Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function', *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), pp. 33289–33297.

Vézina, C., Kudelski, A., Sehgal S.N. (1975) 'Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.', *The Journal of Antibiotics*, 28(10), pp. 721–726.

Wang, J., Menon, S., Yamasaki, A., Chou, H., Walz, T., Jiang, Y. (2013) 'Ypt1 recruits the Atg1 kinase to the preautophagosomal structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), pp. 1–6.

- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., Rubinsztein, D.C. (2003) 'Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(27), pp. 25009–25013.
- Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, Ch., Li, L., Longo, V.D. (2008) 'Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9', *PLoS Genetics*, 4(1), pp. 0139–0149.
- Xiang, J., Chao, D., Korsmeyer, S. (1996) 'BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases', *Cell Biology*, 93(December), pp. 14559–14563.
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-kakuta, Ch., Ichikawa, R., Kinjo, M., Ohsumi, Y. (2012) 'Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation', *The Journal of Cell Biology*, 198(2), pp. 219–233.
- Yeh, Y. Y., Wrasman, K., Herman, P. K. (2010) 'Autophosphorylation within the Atg1 activation loop is required for both kinase activity and the induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 185(3), pp. 871–882.
- Yi, C., Ma, M., Ran, L., Zheng, J., Tong, J., Zhu, J., Ma, Ch., Sun, Y., Zhang, S., Feng, W., Zhu, L., Le, Y., Gong, X., Yan, X., Hong, B., Jiang, F.J., Xie, Z., Miao, D., Deng, H., Yu, L. (2012) 'Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation', *Science*, 336(6080), pp. 474–477.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D.J. (2006) 'Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy', *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp. 30299–30304.
- Yorimitsu, T., He, C., Wang, K., Klionsky, D.J. (2009) 'Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy', *Autophagy*, 5(5), pp. 616–624.
- Yoshiaki K., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y. (2000) 'Tor-mediated Induction of Autophagy Via an Apg1 Protein Kinase Complex', *Journal of Cell Biology*, 150(6), pp. 1507–1513.
- Zhang, Y., Qi, H., Taylor, R., Xu, W., Liu, L.F., Jin, S. (2007) 'The role of autophagy in mitochondria maintenance: Characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains', *Autophagy*, 3(4), pp. 337–346.
- Zhifen Y., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky D.J. (2006) 'Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy', *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp. 5094–5104.
- Zhiping X., Nair, U., Klionsky D.J. (2008) 'Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation', *Molecular biology of the cell*, 19, pp. 3290–3298.